

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

RECOVERY OF beta-AMYLASE FROM WASTE LIQUID OF WHEAT STARCH PREPARATION PROCESS

Patentnumero: JP60027383
Julkaisupäivä: 1985-02-12
Keksijä(t): KATAYAMA MAKOTO others 02
Hakija(t): GURIKO EIYOU SHIYOKUHIN KK
Pyydetty patentti: ☐ JP60027383
Hakemusnumero: JP19830137276-19830727
Prioriteettinumero(t):
IPC-luokitus: C12N9/26
EC-luokitus:
Vastineet: JP1296033C, JP60018393B

Tiivistelmä

PURPOSE To recover beta-amylase from the waste liquid of wheat starch production process, with simple apparatus, at a low cost, by adding sodium alginate to the waste liquid, adjusting to a specific pH, and separating the coagulated beta-amylase.

CONSTITUTION The waste liquid of the wheat starch production process is added with sodium alginate to adjust the pH of the liquid of about 3.7-4.5, and the coagulated beta-amylase is separated and recovered. Preferably, the mixture is adjusted again to about neutral state to solubilize the amylase in a state containing sodium alginate, added with a calcium compound and/or an aluminum compound keeping the pH of the mixture to 5-7.5, and the produced insolubilized calcium alginate, ammonium alginate, etc. are removed to recover beta-amylase.

Tiedot otettu esp@cenet in tietokannasta - 12

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭60—27383

⑬ Int. Cl.⁴
C12 N 9/26

識別記号

庁内整理番号
7236—4B

⑭ 公開 昭和60年(1985)2月12日

発明の数 3
審査請求 有

(全 5 頁)

⑮ 小麦でんぷん製造廃液から β アミラーゼを回収する方法

⑯ 特 願 昭58—137276

⑰ 出 願 昭58(1983)7月27日

⑱ 発 明 者 片山誠

京都府相楽郡山城町平尾中川原

7—4

⑲ 発 明 者 尾上旦

池田市畑4丁目11番4号

⑳ 発 明 者 繁澤裕志

京都市伏見区深草願成町12番地

㉑ 出 願 人 グリコ栄養食品株式会社

大阪市福島区海老江1—13—4

明 細 書

1. 発明の名称

小麦でんぷん製造廃液から β アミラーゼを回収する方法

2. 特許請求の範囲

① 小麦でんぷん製造廃液にアルギン酸ソーダを加え、該液の pH を 3.7 ~ 4.5 付近に調整し、 β アミラーゼを凝集させることを特徴とする小麦でんぷん製造廃液から β アミラーゼを回収する方法。

② 小麦でんぷん製造廃液にアルギン酸ソーダを加え、該液の pH を 3.7 ~ 4.5 付近に調整し、 β アミラーゼを凝集物として回収し、このものの pH を中性付近にもどして可溶化することを特徴とする小麦でんぷん製造廃液から β アミラーゼを回収する方法。

③ 小麦でんぷん製造廃液にアルギン酸ソーダを加え、該液の pH を 3.7 ~ 4.5 付近に調整し、 β アミラーゼを凝集物として回収し、こ

のものの pH を中性付近にもどして可溶化し、この pH を 5 ~ 7.5 に保ちながらこれにカルシウム化合物及び又はアルミニウム化合物を加えて生成する不溶物を除去精製することを特徴とする小麦でんぷん製造廃液から β アミラーゼを回収する方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、小麦でんぷん製造廃液に含まれる β アミラーゼを簡単な設備と簡単な方法、つまり簡易に低コストで回収し又は更にこれを精製する方法に係わるものである。

現在、小麦でんぷん製造廃液は、通常凝集沈殿法或いは活性汚泥法によって浄化したのち放流されねばならず、そのためその処理には膨大な費用を要している。本発明者等は、小麦でんぷん製造廃液に含まれる β アミラーゼを回収する方法について鋭意努力しその結果効率よく簡単な設備、簡単な方法で β アミラーゼを採取すると共に未利用資源であった小麦でんぷん製造廃液を有効に利用し、かつ、廃液処理費用を大

巾に低減させる方法を確認するに至ったものである。

本件技術分野に属する特許として既に特公昭57-52836及び特公昭57-48954がある。ところが特公昭57-52836は合成ケイ酸アルミニウムに β アミラーゼを吸着させ、次いでりん酸塩緩衝液により溶出することとを特徴とし、又特公昭57-48954は小麦でんぷん製造廃液をアミラーゼ給源として利用する方法に関するものであって、いずれも本件発明とはその技術的な構成が全く異っているものである。

本発明者等は、次のような事実を発見し、本発明に至ったものである。即ち

- ① 小麦でんぷん製造に際し副生する廃液（通常、pH 5.5～7.5）をそのまま、又はそれよりpHが低いときは大凡前記範囲にpHを調整してのち、これに1%前後にうすめたアルギン酸ソーダ溶液を廃液に対して約1～12%望ましくは3～8%加え、pHを3.7～4.5

程度望ましくは4.0付近に調整すると液が凝集すること。

- ② この凝集物に大半の β アミラーゼが移行すること。
- ③ この凝集物を遠心分離又は加圧浮上法等により脱水後、pHを約5～7.5望ましくは6～7付近に戻すことによって可溶化できること。
- ④ この可溶化した液に塩化カルシウムの如きカルシウム化合物及び又はミ、ウバンの如きアルミニウム化合物を加えpHを中性にすると凝集物を生じるが β アミラーゼ活性の大部分は液部に移行すること。

次に現在通常に行われている小麦でんぷんの製造法について述べる。一般的に行われているのはマルチン法に準ずる方法であり、更に詳しくは、例えば小麦粉にこれと等量程度の水を加えてドウを作り、次に水洗機中で小麦粉の約10倍量の水で水洗し、でんぷん乳と生グルテンに分離する。得られるでんぷん乳を節別し、ふす

ま区分を除去し、ノズルセパレーター、スクリーマデカンター等で遠心分離するとでんぷん乳と廃液に分別される。

小麦粒の糊粉層付近から分別された末粉を主体とし、これを原料として上記方法に準じて小麦でんぷんを製造するに際して、本発明にかかるアミラーゼはこの廃液区分に移行含有されるもので、その力価は約16～20単位であり、その固形分は約0.8～1.0%である。

上記製造廃液はその製造工程に由来して不溶解物を0～0.5%含むが、更に分離効率の高い遠心機（シャープレス遠心機又はロパル遠心機等）又は濾過によりそれを除去し澄清化することにより、アルギン酸ソーダの添加量を下げることが出来る。廃液を凝集化させる工程（フロック生成工程）に用いる凝集剤としてアルギン酸ソーダがもっとも良く、次いでカラギニンがあり他に効果を認めるものとしてCMCもあるがその効果は参考例1に示すようにアルギン酸ソーダに比較して劣っている。又タマリンド

種子多糖類、グアーガムにはこの効果を認めない。

参考例1

（方法）小麦でんぷん製造廃液（固型分0.9%、 $20^{\circ}\text{U}/\text{ml}$ ）1ℓに1%アルギン酸ソーダ溶液、1%カラギニン溶液、1%CMC溶液を夫々20 \pm ml～80 \pm ml（2～8%）加えた後、10倍に希釈した塩酸でpH 4.0に調整し、フロックを作り、このフロックを遠心分離（4000rpm、5分）しケーキとして回収し、このケーキを第2リン酸ソーダ溶液中で中和溶解（pH 6.5）し全容を100mlとした。以下遠心分離の上澄液及び中和溶解物の β アミラーゼ活性を第1表に示す。

第1表 小麦でんぷん製造廃液に対する各種凝集剤の効果

凝集剤の種類と添加量	β アミラーゼ活性 U/ml	
	遠心分離上澄区	中和溶解物
1%アルギン酸ソーダ 2%	1.5	4.5
" 4%	3.7	10.5
" 6%	0	12.1
" 8%	0	12.1
1%カラギニン 2%	1.5	4.2
" 4%	1.4	4.0
" 6%	1.0	5.1
" 8%	6	8.2
1%CMC 2%	1.9	1.0
" 4%	1.9	1.1
" 6%	1.5	2.2
" 8%	1.0	4.0

第2表 小麦でんぷん製造廃液と分離大豆蛋白質製造廃液の相互比較

各製造廃液に対する1% アルギン酸ソーダ溶液の 添加量	β アミラーゼ活性 U/ml			
	小麦でんぷん製造廃液		分離大豆蛋白質製造廃液	
	遠心上澄区	中和溶解物	遠心上澄区	中和溶解物
1%アルギン酸ソーダ2%	1.5	4.5	1.9	5
" 4%	3.7	10.5	1.9	5
" 6%	0	12.1	1.8	8
" 8%	0	12.1	1.8	8

参考例2に示したように分離大豆蛋白質製造廃液より小麦でんぷん製造廃液の方が良好であった。これは分離大豆蛋白質製造廃液の方が水溶性の不純物がかなり多い為と思われる。分離大豆蛋白質製造廃液の場合、アルギン酸ソーダの添加量をふやすと凝集効果を高めることはできるが、溶液の粘性が高くなり後の分別操作がやりにくいという欠点がある。

本発明の内容を β アミラーゼの挙動を中心に考えると次のようである。小麦でんぷん製造廃液は通常pH 5～7であるがこの中の β アミラーゼはアルギン酸ソーダを加えpHを4.0付近

次に小麦でんぷん製造廃液と同様 β アミラーゼ給源として知られている分離大豆蛋白質製造廃液との相互比較を参考例2に示す。

参考例2

(方法) 小麦でんぷん製造廃液(pH 5.8、 $20 U/ml$ 、固型分0.9%)又は分離大豆蛋白質製造廃液(pH 5.8、 $20 U/ml$ 、固型分3%)1ℓに1%アルギン酸ソーダ溶液を20～80 ml(2～8%)加えた後、10倍に希釈した塩酸でpH 4.0に調整し凝集させ、遠心分離(4,000 rpm、5分)し、フロックをケーキとして回収し、このケーキを第2リン酸ソーダ溶液で中和溶解し全容を100 mlとした。以下遠心分離の上澄区及び中和溶解物の β アミラーゼ活性を第2表に示す。

にすることによってアルギン酸と結合した形で凝集し、凝集物を遠心分離又は加圧浮上法等の手段で回収することにより β アミラーゼを簡単に廃液中から回収することが可能となる。これが第1発明である。もちろん廃液にアルギン酸ソーダを加えないでpHを4.0に調整しても凝集はおこらない。第2発明は、この不溶物として回収した β アミラーゼを含んだ凝集物のpHを中性付近に調整することによってアルギン酸ソーダを含んだままアミラーゼを可溶化したものである。この可溶化物をそのまま噴霧乾燥機などで乾燥粉末化することにより粗 β アミラーゼを製造することができる。ただし可溶化はされているが、この状態では溶液の粘度も高く、pH 4.5以下では再び不溶化し、又無菌処理が出来ない等の欠点を有する。しかし上記可溶化物は塩化カルシウム等のカルシウム化合物及び又はミョウバンの如きアルミニウム化合物を加え、pHを中性付近にすることによって再び β アミラーゼは遊離し、アルギン酸ソーダはアル

ギン酸カルシウム及び又はアルギン酸アルミニウムとして不溶化（ゲル化）する。これが第3発明であり、この際不溶化したアルギン酸カルシウム及び又はアルギン酸アルミニウム中にはほとんどβアミラーゼ活性はなく、この不溶化物を圧搾濾過などの手段で分別除去することにより、アルギン酸カルシウム及び又はアルギン酸アルミニウムと遊離した状態で溶液中にβアミラーゼは移行する。この液は無菌濾過することとも出来るし、pH 4.5以下で不溶化せず又限外濃縮により更に精製することとも可能である。上記可溶化物からβアミラーゼを遊離させる時に用いるカルシウム化合物及び又はアルミニウム化合物はβアミラーゼの安定pH領域（pH 3.8～7.8）の範囲内で使用すれば何を用いてもよく、たとえば塩化カルシウム、乳酸カルシウム、リン酸カルシウム、カリミョウバン、アンモニウムミョウバン、塩化アルミニウムなどでもよいが、溶解性から考えると塩化カルシウム及び又はアンモニウムミョウバンが良いよう

刺に添加することが最良である。

このようにして得られた酵素液は通常の濃縮法、たとえば限外濃縮、減圧濃縮、塩析、有機溶媒による沈殿その他の手段によって濃縮してもよい。

以下実施例をあげ本発明の内容を詳述する。

実施例1

日清製粉株式会社製の小麦粉青銀杏500kgに水400ℓを加え、ニーダーで混練しドウを作り30分間放置後水洗機に移し、水4000ℓで水洗し生グルテン259kgとでん粉濃度約6.8%の粗でん粉乳約3700ℓを得た。この粗でん粉乳は遠心篩（120メッシュ）で赤粕区分を除去し、次にノズルセパレーターによってでん粉濃度約14%のでん粉乳約1700ℓと廃液約2000ℓを得た。この廃液はβアミラーゼ力価20単位でその固形分は0.9%である。この廃液（pH 5.7）にあらかじめ別の槽で溶解した1%アルギン酸ソーダ溶液72ℓを加え、10倍に希釈した塩酸でよく攪拌しながらpH

である。又圧搾濾過によって得られるβアミラーゼ活性のないケーキ、即ちアルギン酸カルシウム及び又はアルギン酸アルミニウムは酸処理、水洗、アルカリ処理などの方法でカルシウム及び又はアルミニウムを除去し、アルギン酸ソーダとして回収し再び使用することができる。

カルシウム化合物及び又はアルミニウム化合物の添加量は、アルギン酸ソーダの全量をアルギン酸カルシウム及び又はアルギン酸アルミニウムにするだけの量が必要である。即ちカルシウム化合物及び又はアルミニウム化合物の添加量が少なく生成ゲルが粘性を示し、圧搾濾過しにくいし又カルシウム化合物及び又はアルミニウム化合物が多すぎても必要以上にβアミラーゼ溶液中にカルシウム及び又はアルミニウムが存在することになり以後の精製処理のさまたげとなる。ただしある程度のカルシウムの存在はむしろβアミラーゼの安定化の一助となるため、カルシウム化合物の場合アルギン酸ソーダの全量をアルギン酸カルシウムにする量より過

4.0に調整後この液を無孔壁の遠心分離機にかける固型分25%の脱水ケーキ19kgを得、真空乾燥機で乾燥し粗βアミラーゼ粉末4.7kg

（4,500 U/g）を得た。

実施例2

日清製粉株式会社製の小麦粉青銀杏500kgに水400ℓを加え、ニーダーで混練しドウを作り30分間放置後水洗機に移し、水4000ℓで水洗し生グルテン259kgとでん粉濃度約6.8%の粗でん粉乳約3700ℓを得た。この粗でん粉乳は遠心篩（120メッシュ）で赤粕区分を除去し、次にノズルセパレーターによってでん粉濃度約14%のでん粉乳約1700ℓと廃液約2000ℓを得た。この廃液はβアミラーゼ力価20単位でその固形分は0.9%である。この廃液（pH 5.7）にあらかじめ別の槽で溶解した1%アルギン酸ソーダ溶液72ℓを加え、10倍に希釈した塩酸でよく攪拌しながらpH 4.0に調整後通常の加圧浮上処理により凝集物を回収し固型分6%のペースト状液80ℓを得

た。これに第2リン酸ソーダ400gを加えて溶解し(pH 6.8、固型分6.6%、粘度800cp、活性300 μ /g)ノズル式の噴霧乾燥機で乾燥し粗 β -アミラーゼ粉末5.2kg(4,100 μ /g)を得た。

実施例3

実施例2と同様に処理して得たペースト状液80ℓに第2リン酸ソーダ400gを加えて溶解し(pH 6.8、固型分6.6%、粘度800cp、活性300 μ /g)、次いで20%塩化カルシウム溶液33ℓを加え、pHを7.0に調整後、圧搾ろ過機でしぼり清澄液85ℓを得た。次に残液に水3.5ℓを加え再び圧搾ろ過機でしぼり清澄液3.5ℓを得た。清澄液を合し(120ℓ)限外濃縮機(鐘淵化学工業株式会社PS-15ポリスルホン膜、標準分画分子量15000)で濃縮し、濃縮液24ℓを得、これを無菌ろ過後噴霧乾燥機(入口温度155℃、出口温度70℃)で乾燥し精製 β -アミラーゼ粉末3.1kg(6320 μ /g)を得た。

フェーリングレーマン・ショール法でブドウ糖として定量

参考：1単位とは酵素グラム当り1分間にブドウ糖として1mg生成する力価を示す。

実施例4

実施例2と同様に処理して得たペースト状液80ℓに第2リン酸ソーダ400gを加えて溶解し(pH 6.8、固型分6.6%、粘度800cp、活性300 μ /g)、この液のpHを6.8に調整しながら徐々に8%アンモニウムミョウバン溶液3.3ℓを加えた後、圧搾ろ過機でしぼり清澄液85ℓを得た。次に残液に水3.5ℓを加え再び圧搾ろ過機でしぼり清澄液3.5ℓを得た。清澄液を合し(120ℓ)限外濃縮機(旭化成工業株式会社SIP-3013分画分子量6000)で濃縮し、濃縮液24ℓを得、これに無菌ろ過後噴霧乾燥機(入口温度155℃、出口温度70℃)で乾燥し精製 β -アミラーゼ粉末2.0kg(9310 μ /g)を得た。

(注) アミラーゼ力価

2%可溶性でんぷん 20ml

(pH 5.5の0.02M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液に溶解)

↓ 酵素液
40℃ 30分反応